



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 59 930 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 39/395**

②① Aktenzeichen: 100 59 930.3  
②② Anmeldetag: 23. 11. 2000  
④③ Offenlegungstag: 29. 5. 2002

**DE 100 59 930 A 1**

⑦① **Anmelder:**  
Fischer, Peter, Dr., 13505 Berlin, DE;  
Uttenreuther-Fischer, Martina, Dr., 13505 Berlin, DE

⑦② **Erfinder:**  
Uttenreuther-Fischer, Martina, Dr., 13505 Berlin, DE;  
Krüger, Jörg, 10178 Berlin, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤④ **Mittel humanen Ursprungs zur Vakzination gegen GD2-pos. Tumore**

⑤⑦ Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen das Disialogangliosid GD2 bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wie dem Neuroblastom und dem Melanom zeigen, daß für therapeutische Langzeiteffekte wahrscheinlich eine Immunisierung gegen tumorassoziierte Antigene notwendig ist.

Die direkte Vakzinierung mit GD2 ist wegen der schwierigen Aufreinigung, schlechter Wasserlöslichkeit und geringer Immunogenität therapeutisch nicht geeignet. Als Ersatz können antiidiotypische Antikörper (anti-Id) gegen anti-GD2-Antikörper dienen, die GD2 imitieren, so daß sie gegen GD2 immunogen wirken.

Die bisher in klinischen Studien eingesetzten anti-Ids gegen GD2-Ak sind wegen murinen Ursprungs nur suboptimal für die Therapie geeignet. Humane anti-Ids, die bisher mittels EBV-/Hybridomtechnik hergestellt wurden, haben u. a. wegen Instabilität keine therapeutische Anwendung gefunden.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, mittels rekombinanter Technologien (Phagen Display) stabile anti-Ids gegen GD2-Ak humanen Ursprungs zu klonieren. Diese werden als Arzneimittel zur Therapie von (GD2)-positiven Tumoren und in der begleitenden Diagnostik Anwendung finden.

**DE 100 59 930 A 1**

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Therapie von Tumoren, insbesondere von Neuroblastomen und Melanomen, auf der Basis von rekombinanten Antikörperfragmenten humanen Ursprungs, die die körpereigene Immunantwort gegen Disialogangliosid(GD2)-positive Tumore stimulieren. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

#### Einleitung, Stand der Technik

#### Immuntherapie des Neuroblastoms

**[0002]** Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle, solide Tumor im Kindesalter. Der Tumor entstammt histologisch Gewebe postganglionärer Neuronen und manifestiert sich meist im Nebennierenmark oder im Bereich der Ganglien des sympathischen Grenzstranges. Das Neuroblastom besitzt zum einen die Fähigkeit zur Spontanregression, zum anderen kann es zum benignen Ganglioneurom ausreifen oder schließlich sich rasch progredient im ganzen Organismus ausbreiten. Alle drei Charakteristika machen die besondere Stellung der Erkrankung in der pädiatrischen Onkologie aus.

**[0003]** Die Prognose der progredienten Neuroblastomkrankung ist unverändert schlecht und liegt insgesamt bei einer 5-Jahresüberlebensrate von 8–33%. Derzeit scheint es wenig wahrscheinlich, daß ein systematisches Screening nach Neuroblastomkrankungen die Inzidenz progredienter Erkrankungen senken kann. Neben der aus chirurgischer, Chemo- und Radiotherapie bestehenden konventionellen Therapie werden auch einige experimentelle Strategien eingesetzt, von denen bisher keine zum Durchbruch für die Behandlung der Patienten geführt hat. Eine Bewertung der MIBG-, Hochdosistherapie mit anschließender Stammzellrecue ist derzeit noch nicht möglich.

**[0004]** Ein vielversprechendes experimentelles Therapieverfahren des metastasierten Neuroblastoms ist, v. a. im adjuvanten Setting die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (MAk) und MAk-Konjugaten. Ein potentielles Zielantigen für die Immuntherapie des Neuroblastoms ist GD2, ein Glycosphingolipid aus der Gruppe der Ganglioside. GD2 wird uniform auf Geweben neuroektodermalen Ursprungs exprimiert, die Expression in normalem Gewebe ist auf Neuronen und Hautmelanozyten restringiert. Bei malignen Erkrankungen neuroektodermalen Ursprungs wie dem Neuroblastom und dem Melanom sowie beim kleinzelligen Lungenkarzinom, Osteosarkom, Rhabdomyosarkom und wenigen Nephroblastomen kommt es zu stark vermehrter GD2-Expression im Tumorgewebe. Diese Eigenschaft erweitert den Anwendungsrahmen der gegen GD2 gerichteten Therapien über die Behandlung des Neuroblastoms hinaus.

**[0005]** Cheung et al. nutzten mit erstem therapeutischen Erfolg GD2 als Targetantigen für Immuntherapiestudien beim Neuroblastom mit einem murinen, monoklonalen anti-GD2 Antikörper, 3F8. Mujoo et al. klonierten 1987 einen anderen murinen anti-GD2 MAk vom IgG3 Isotyp, MAk 14.18, mit einer Affinitätskonstante von  $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Der MAk zeigte biologische Effizienz im Sinne einer Tumorzellzyklusblockade durch CDC und ADCC in vitro und im Tierversuch. Die Tumorzellproliferation im Tiermodell wurde supprimiert. 1989 selektierten Mujoo et al. aus einer Familie von Isotyp-Switch-Varianten des IgG3-produzierenden Hybridoms 14.18 eine IgG2a Switch-Variante, MAk 14G2a, deren biologische Wirksamkeit in der Tumorzellzyklusblockade dem Ursprungsklon 14.18 vergleichbar war. Aufgrund der besseren Stabilität des IgG2a-Isotyps, sowie identischer biologischer Eigenschaften (ADCC und CDC in vitro und in vivo), wurde in einer ersten Phase I Studie an Neuroblastom- und GD2(+)-Osteosarkom-Patienten das Nebenwirkungsspektrum der Immuntherapie mit 14G2a determiniert sowie versucht, die MTD (maximal tolerierte Dosis) zu etablieren.

**[0006]** Die relativ starke Immunogenität (Induktion von IAMA, humane anti-Maus-Antikörper) des murinen anti-GD2-MAks 14G2a zum einen, und die therapeutische Effizienz in der Therapie der refraktären Neuroblastomkrankung zum anderen, führten zur molekularbiologischen Klonierung eines chimären human/murinen anti-GD2 MAks ch14.18, aus den variablen Anteilen des parentalen murinen IgG3-MAks 14.18 und humanen konstanten Anteilen (IgG1). Auch dieser chimäre Antikörper wurde in verschiedenen Phase I-Studien (s. u.) in der Therapie der progredienten Neuroblastomkrankung evaluiert und sogar hier mit therapeutischen Erfolg eingesetzt. Trotz des verminderten immunogenen Potentials des chimären Antikörpers führte auch die Therapie mit ch14.18 zur Induktion einer humoralen Immunantwort. Diese gegen ch14.18 induzierten Patientenantikörper wurden als antiidiotypische Antikörper charakterisiert und könnten dessen therapeutische Wirkung mitbegründen (s. Fig. 1).

**[0007]** Die therapeutische Effizienz von monoklonalen Antikörpern für die Immuntherapie versucht man derzeit auf zweierlei Weisen zu verbessern. Eine Möglichkeit besteht in der Produktion therapeutisch effizienterer Moleküle in Form von Immuntoxinen, Radio-Immunkonjugaten, Fusionsproteinen, bispezifischen Antikörpern, ADEPT etc., um die Lyse der Tumorzellen durch direkte Toxizität der Konjugate oder durch verbesserte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen im Tumor zu erreichen. Die zweite Möglichkeit basiert auf der Jerne'schen Netzwerktheorie (s. Fig. 1). Hierbei wird die körpereigene Immunabwehr durch den infundierten ersten Antikörper (Ab1) aktiviert. Dieser auch als Antigen wirkende Ab1 ruft eine Abwehrreaktion des Immunsystems hervor, die auch zur Produktion von antiidiotypischen internal-image-Antikörpern (Ab2ß) führt. Diese internal-image-Antikörper haben strukturell dem ursprünglichen Antigen (z. B. GD2) vergleichbare Epitope und induzieren anti-antiidiotypische Antikörper (Ab3), die auch mit dem Tumorantigen reagieren können und zur Tumorzellzyklusblockade führen (s. Fig. 1).

**[0008]** Studien von Baum et al. unterstützen die Hypothese, daß solche antiidiotypischen Antikörper (Ab2) therapeutische Relevanz haben, indem sie als interne Tumorzellvakzine wirken. Cheung et al. konnten vor kurzem zeigen, daß die Überlebensrate beim metastasierten Neuroblastom mit der Bildung von Ab3, initiiert durch die Gabe von Ab1, korreliert. Beide Wege sind erfolgversprechend und möglicherweise synergistisch. Die Zukunft wird zeigen, welcher die meisten Chancen für die Patienten mit ausgedehnter Neuroblastomkrankung bietet, die immer noch eine Herausforderung für die pädiatrische Onkologie darstellt.

**[0009]** Für die Notwendigkeit eines Vakzinationseffektes sprechen die Erfolge mit Immunproteinen aus ch14.18 und IL-2, GM-CSF oder Superantigenen. Wie im Tiermodell für das Neuroblastom und Melanom demonstriert wurde, führte das Fusionsprotein ch14.18-IL2 u. a. zur Aktivierung von NK und CD8+ T-Zellen. Bedeutend war der Nachweis, daß

auch heterogene Tumore aus GD2-positiven und negativen Zelllinien durch die Wirkung des Fusionsproteins vollständig eliminiert wurden und ein langanhaltender Schutz gegen Tumorzellen (Vakzinations-Effekt) vorhanden war.

**[0010]** Neben der therapeutischen Relevanz als interne Vakzine und ihrer Bedeutung als Vergleich zu antiidiotypischen Antikörpern bei der Regulation von Autoimmunerkrankungen, spielen antiidiotypische Antikörper eine Rolle als potentielle Tumorstoffe. Antiidiotypische Maus-Antikörper, die GD2 imitieren, können im Tierexperiment Antikörper gegen GD2 induzieren. Auch bei Melanompatienten konnten nach der Immunisierung mit antiidiotypischen Antikörpern in über 85% der Fälle Ab3 gegen GD2 im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Die direkte Immunisierung mit Gangliosiden weist zahlreiche Schwierigkeiten auf: wegen ihrer geringen Immunogenität sind Kopplungen mit Adjuvantien notwendig, darüber hinaus ist die Aufreinigung schwierig und sehr kostenaufwendig und die Wasserlöslichkeit sehr schlecht. Antiidiotypische Antikörper sind daher potentielle Kandidaten für erfolgreiche Immunisierungen.

#### Überblick über Klinische Studien mit anti-GD2 Antikörpern

##### Phase I-Studie mit murinem MAK 14G2a

##### Studiendesign

- 15 Patienten, ausschließlich atherapierte Patienten mit GD2-positiver Neuroblastom- und Osteosarkomkrankung;
- 17 Therapiezyklen;
- Dosisesskalation von 25–500 mg/m<sup>2</sup>;
- Hauptnebenwirkungen: Tachykardie, Schmerzen, Fieber und Hyponatriämie sowie eine passagere Hypertonie.
- WHO-Klassifikation der Toxizität: Sämtliche Nebenwirkungen entsprachen den Schweregraden I und II, waren kontrollierbar, tolerierbar und reversibel.
- MTD: wurde nicht erreicht.
- Clearance: biphasisch mit einer  $\alpha$ -Halbwertszeit von  $3,8 \pm 3,9$  h und einer  $\beta$ -Halbwertszeit von  $22,3 \pm 10,4$  h.
- Immunogenität: 14/15 Patienten produzierten HAMA. Von 12 untersuchten Patienten zeigten vier eine ausschließlich gegen die variable Region des Antikörpers gerichtete Immunantwort, 8 eine sowohl gegen die variable als auch gegen die konstante Region des Antikörpers gerichtete Immunantwort.
- Effizienz: Es zeigte sich eine komplette Remission (CR), drei Mixed Responses (MR) und eine stabile Erkrankung (SD) in 15 Patienten.

##### Phase I-Studie mit chimärem Antikörper ch14.18

##### Studiendesign

- 11 Patienten, Einschlusskriterien wie oben;
- 20 Therapiezyklen;
- Dosisesskalation 10–200 mg/m<sup>2</sup>;
- Hauptnebenwirkungen: wie oben
- WHO-Klassifikation der Toxizität: wie oben;
- MTD: wurde nicht erreicht, OBD (optimum biological dose): 200 mg/m<sup>2</sup>.
- Clearance: biphasisch; ch14.18 zeigte eine  $\alpha$ -Halbwertszeit von  $3,4 \pm 3,1$  h und eine längere  $\beta$ -Halbwertszeit von  $66,6 \pm 27,4$  h bei Erstapplikation. Bei wiederholter Infusion nahm die  $\beta$ -Halbwertszeit auf  $31,7 \pm 18,4$  h ab.
- Immunogenität: 6/11 Patienten entwickelten antiidiotypische Antikörper gegen ch14.18.
- Effizienz: MAK ch14.18 zeigte an 11 Patienten mit 1 CR, 1 PR, 3 MR und 2 SD therapeutische Effizienz. Hierbei war ch14.18 v. a. in der Therapie refraktärer Knochenmarksmetastasen therapeutisch wirksam.

##### Phase II-Studie mit ch14.18 und GM-CSF

##### Studiendesign (Pilotphase)

- 9 Patienten, Einschlusskriterien wie oben;
- 19 Therapiezyklen, wiederholte Therapie möglich;
- Dosis: 200 mg/m<sup>2</sup> ch14.18 (Tag 1–4), d. h. 50 mg/m<sup>2</sup>/d;
- 10  $\mu$ g/kg/d GM-CSF s. c. (Tag 1–14);
- Studienziel: In dieser Pilotstudie wurde der in vivo-Effekt einer Aktivierung der ADCC neutrophiler Granulozyten überprüft, sowie das Nebenwirkungsspektrum und die therapeutische Effizienz obiger Medikamentenkombination.
- Nebenwirkungen sowie die Clearance sind den oben für ch14.18 alleine ausgeführten vergleichbar. Die klinische Effizienz lag bislang bei 2 CR, 1 MR, 1 minimale Response, 2 SD (FACR Berlin und GPOH Berlin, 1994).

##### Phase III-Studie mit ch14.18 an der Charité

**[0011]** Inzwischen wurde die Immuntherapie mit MAK ch14.18, der jetzt in ausreichender Menge zur Verfügung steht, in die jüngste, bundesweite Neuroblastomstudie NB97 aufgenommen, an der auch wir beteiligt sind. An der Charité wurden bislang neun Patienten mit ch14.18 behandelt.

**[0012]** Mit dem Ziel, humane antiidiotypische Antikörper zu klonieren, wurden z. B. K6H6/B5-Heteromyelomzellen mit EBV-transformierten Lymphozyten von mit ch14.18 behandelten Patienten fusioniert. Klone, die Antikörper gegen die variable Region von ch14.18 bzw. 14G2a produzierten, wurden selektiert. Solche Hybridomzellen wurden u. a. von Fischer und Uttenreuther-Fischer an der University of California hergestellt. Aus den Zellüberständen ließen sich affinitätschromatographisch Antikörper aufreinigen, die in den ELISAs wie Antiidiotypen reagierten. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, daß die Antikörper von den Hybridomen nur unvollständig oder in sehr geringen Menge sezerniert werden, so daß sie sich für in vivo-Experimente und für weitere Charakterisierungen nicht eignen.

## Beschreibung der Erfindung

## Stabile, humane antiidiotypische Ak-Fab-Fragmente gegen anti-GD2-Ak aus einer Phagen Display-Bibliothek

**[0013]** Als weitere Strategie für die Klonierung neuer stabiler Antikörper bot sich die Phagen-Display Technik an. Um einen geeigneten Patienten für das Ausgangsmaterial zu identifizieren, wurde ein ELISA auf 14G2a etabliert. Seren von im Rahmen der NB97-Studie an der Charité mit dem Antikörper ch14.18 behandelten Patienten wurden getestet, und es fand sich ein Patient (Patient B), der besonders hohe antiidiotypische Titer gegen 14G2a aufwies (s. **Fig. 2**).

**[0014]** Es zeigte sich, daß die gefundenen Antiidiotypen vor allem den Subklassen IgG1 und 2 angehören und sowohl lambda als auch kappa Leichtketten benutzen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß das Patientenserum von Patient B die Bindung von ch14.18 an GD2 hemmt: eine notwendige Bedingung für einen Internal Image Antikörper.

**[0015]** Nach einem ausführlichen Elterngespräch über die geplanten Experimente und schriftlicher Zustimmung der Eltern zur Probengewinnung wurde aus den B-Zellen dieses Patienten RNA isoliert und die Sequenzen der schweren und leichten Kette mittels RT-PCR amplifiziert (s. **Fig. 3**).

**[0016]** Insgesamt wurden vier Antikörper Phagen-Display Bibliotheken in dem Vektor pComb3H erstellt: IgG1-kappa, IgG1-lambda, IgG2-kappa und IgG2-lambda. Die IgG1 u. IgG2-kappa Bibliotheken wurden durch wiederholtes Biopanning sowohl auf 14G2a als auch auf ch14.18 selektiert. Der Anstieg der spezifisch selektierten Phagentiter läßt sich sowohl im Anstieg des Phagentiters als auch im ELISA von der Antikörper-Bibliothek über die einzelnen Biopanningschritte (PI-PIV) sehr schön aufzeigen (s. Tabelle 1, **Fig. 4**). Vergleichbare Anstiege ergaben sich auch bei den lambda-Bibliotheken.

Tabelle 1

Gesamt-Phagentiter der Fab-exprimierenden Phagen vor und nach den einzelnen Biopanning Schritten auf 14G2a. Es ist ein deutlicher Anstieg der bindenden Phagen zu sehen

	input	output	input/output
Panning I	$3,48 * 10^{12}$	$1,6 * 10^7$	$4,6 * 10^{-4} \%$
Panning II	$1,5 * 10^{10}$	$5,3 * 10^5$	$3,5 * 10^{-3} \%$
Panning III	$2,1 * 10^{10}$	$8,5 * 10^6$	$4,0 * 10^{-2} \%$
Panning IV	$9,8 * 10^9$	$1,5 * 10^8$	$1,5 \%$

**[0017]** Insgesamt konnten mehrere Klone selektiert werden, die sehr spezifisch sowohl 14G2a als auch ch14.18 binden und damit Antiidiotypen darstellen. Die Klone gehören den Subklassen IgG1 und IgG2 an und verwenden sowohl kappa als auch lambda Leichtketten. Von den Klonen wurden Fab-Fragmente hergestellt, die z. T. affinitätschromatographisch über immobilisierte Anti-human-Fab Antikörper in der FPLC aufgereinigt wurden. Die Fab-Fragmente ihrerseits zeigten eine Konkurrenz der Bindung von ch14.18 auf GD2 wie das ursprüngliche Patientenserum (**Fig. 5**). Damit erfüllen sie die Voraussetzungen für einen Internal-Image Antikörper. Der Beweis hierfür wurde durch erfolgreiche Induktion von Ab3 (gegen GD2) (s. **Fig. 1**) im Tier (s. u.) erbracht.

Tierexperiment zum Testen, ob die antiidiotypischen Antikörper im Kaninchen Ab3 im Sinne von Jernes Netzwerk-Theorie induzieren können

**[0018]** Die Aufreinigung der Fab-Fragmente wurden soweit optimiert, daß die gefundenen Klone im Tierexperiment bezüglich ihrer Fähigkeit, Ab3 nach Jernes Netzwerktheorie zu induzieren, getestet werden konnten, und sich damit für eine Tumorstimulation eignen. Als Tiermodell wurden Kaninchen eingesetzt, da die GD2-Verteilung im Kaninchen der Verteilung im Menschen ähnelt. Seren der Tiere nach der Immunisierung mit den repräsentativen Klonen GK2 bzw. GK8 wurden im ELISA getestet und zeigten Bindung an GD2 im Vergleich zu Präimmunserum und einem Kontrollklon (s. **Fig. 6**).

## Zweck der Erfindung

**[0019]** Die bisher in klinischen Studien eingesetzten anti-GD2-Antikörper induzierenden anti-Ids sind nicht humanen Ursprungs, sondern stammen aus immunisierten Mäusen und sind daher nur suboptimal für die Therapie von Menschen

geeignet. Bisherige Therapieversuche mit monoklonalen Antikörpern aus der Maus führen besonders durch das Hervorrufen einer Antikörper-Immunantwort gegen das therapeutische Agens (Anti-Isotyp-, HAMA-Response) zu allergischen Nebenwirkungen bei repetitiver Applikation. Bei rascher Clearance von Xeno-Proteinen und vornehmlich einer Anti-Isotyp-Immunantwort (siehe auch Phase I-Studie mit 14G2a) liegt hier eine suboptimale Vakzinierung gegen das Tumor-Antigen vor. Die hierbei gebildeten HAMA-Antikörper verhindern eine Mehrfachanwendung des therapeutischen Antikörpers, da der Patient Gefahr läuft schwere, allergische Reaktionen zu entwickeln. Weiterhin muß der therapeutische/Vakzinationseffekt repetitiver anti-GD2-Ak-Gaben aufgrund der raschen Neutralisation durch gebildete HAMA-Antikörper hinterfragt werden. Bisherige Klonierungen entsprechender humaner anti-Ids über EBV/Hybridomtechnik führten wegen Instabilität der Hybridome und schlechter Ausbeute nicht zu klinisch einsetzbaren, humanen Vakzinen.

**[0020]** Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, komplett humane, stabile Antiidiotypen gegen GD2-Ak zu entwickeln.

**[0021]** Die beschriebene Erfindung eines rekombinant hergestellten therapeutischen Antiidiotypen gegen GD2-Ak ermöglicht deshalb im besonderen:

1. Die Vermeidung einer HAMA-Response gegen das therapeutische Agens, und damit geringere Nebenwirkungen für den Patienten.
2. Die bessere Induktion von Ab3 über prolongierte Zirkulation im System und damit effizientere endogene Tumorzelllyse.
3. Eine wiederholte Anwendung der Therapie wegen geringerer Immunantwort gegen unerwünschte Epitope. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Vakzinationseffekte für dauerhaften Schutz repetitiver Boosterungen bedürfen. Ähnlich der Infektiologie muß ein analoges Vorgehen lebenslang auch für eine Tumorstimmung postuliert werden.
4. T-Zellaktivierung, insbesondere von Bedeutung, da sich Tumore in der Regel durch fehlende Expression von MHC einer Erkennung durch T-Zellen entziehen.
5. Die effiziente Herstellung des Agens in Form eines Fusionsproteins oder einer DNA-Vakzine.
6. Möglichkeit zur verbilligten Massenproduktion durch rekombinante Expression in *E. coli* oder anderen Massenkulturen (*Pichia Pastoris*, *Saccharomyces*, CHO-Zellkultur), oder in transgenen Pflanzen oder Tieren.

**[0022]** Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

**[0023]** Die folgenden Ausführungsbeispiele sowie die Figur erläutern die Erfindung, ohne sie auf diese Beispiele einzuschränken.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

**[0024]** Vakzinierung mit den antiidiotypischen Antikörper-Fragmenten oder deren antigenen Komponenten, die die Bildung von Antikörpern gegen GD2 stimulieren. Dies führt zu einer Aktivierung des Immunsystems des Tumorkranken, welche sich gegen den Tumor (insbesondere Neuroblastome und Melanome) richtet und diesen dadurch kontrollieren oder zerstören kann.

##### Beispiel 2

**[0025]** Vakzinierung mit Anteilen der antiidiotypischen Antikörper in Form von DNA (z. B. Plasmid-Vektor) bzw. RNA.

##### Beispiel 3

**[0026]** Das Mittel kann zur Vakzination gegen Tumoren verwendet werden, indem Anteile des humanen, rekombinanten Antikörperfragments (Peptide) mit Adjuvantien wie z. B. Lipopeptiden gekoppelt wird.

##### Beispiel 4

**[0027]** Das Mittel kann zur Vakzination gegen Tumoren verwendet werden, indem die gegen GD2 immunogen wirkenden Anteile des humanen Antikörperfragments in andere Proteine eingebaut wird.

##### Beispiel 5

**[0028]** Das Mittel kann zur Verlaufskontrolle, Bestimmung der Pharmakokinetik etc. bei immunmodulatorischer Therapie wie auch Antikörpertherapie von Patienten dienen, indem die gegen GD2 immunogen wirkenden Anteile des humanen Antikörperfragments zur Detektion bzw. Quantifizierung von anti-GD2-Antikörpertitern eingesetzt wird.

##### Beispiel 6

**[0029]** Das Mittel kann zur Qualitätskontrolle von anti-GD2-Antikörperpräparaten verwendet werden.

#### Anhang: Ausgewählte Referenzen

Fischer P. Selection of human antibody fragments by anti-idiotypic interaction. In: Kontermann R, Dübel S, (eds.) Anti-

body Engineering – Springer Lab Manual ed. Heidelberg: Springer, in press; 2000.

Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Tsui CC, Gillies SD, Reisfeld RA, Kung F. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2169–2180.

5 Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Yu AL. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 1995; 41: 331–338.

Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Reisfeld RA, Yu AL. Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in a phase I trial in pediatric cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 1995; 41: 29–36.

10 Uttenreuther MM. Das Neuroblastom – neue therapeutische Perspektiven. In: Gaedicke G, (ed.) *Jahrbuch für Pädiatrie* 1995. Zülrich: Biermann; 1995: 111–128.

#### Patentansprüche

15 1. Mittel zur Therapie von GD2-positiven Tumoren, insbesondere Neuroblastomen und Melanomen, auf der Basis von humanen Antikörperanteilen, die eine Aktivierung des Immunsystems gegen GD2, insbesondere die Bildung von anti-GD2-Antikörpern, stimulieren.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die natürliche, rekombinante oder synthetische Vakzine, welche die Immunisierung gegen GD2 bewirkt, aus einem humanen Antikörper-Fragment abgeleitet ist, insbesondere aus den hier beschriebenen.

20 3. Mittel nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die natürliche, rekombinante oder synthetische Vakzine, welche die Immunisierung gegen GD2 bewirkt, die Aminosäuresequenzen der (hyper)variablen Regionen aus **Fig. 7** enthält.

25 4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die immunogene Region einer natürlichen, rekombinanten oder synthetischen Vakzine, insbesondere eines Antikörperfragments, mindestens zu 80% homolog zu einer der hypervariablen Regionen (= CDR), insbesondere der CDR3 der schweren oder leichten Kette (s. **Fig. 7**), ist.

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

---

30

35

40

45

50

55

60

65

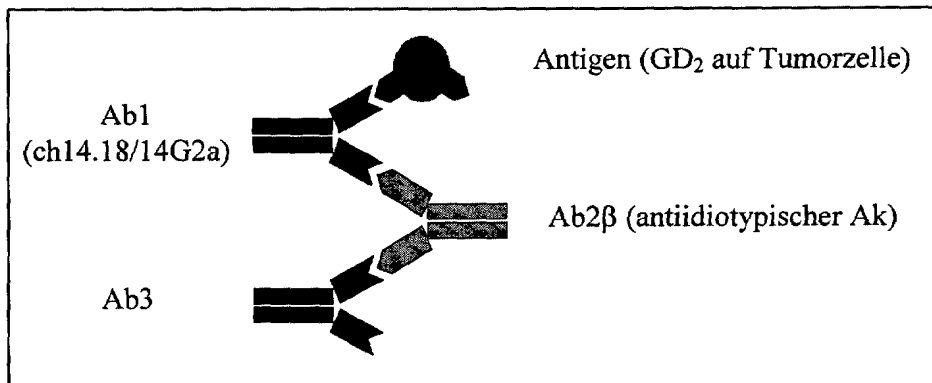


Fig. 1: Netzwerk antiidiotypischer "internal image" Antikörper. Ab3 erkennt das gleiche Epitop wie Ab1 (ch14.18, 14G2a) und bindet daher auch das ursprüngliche Antigen (s. Text)

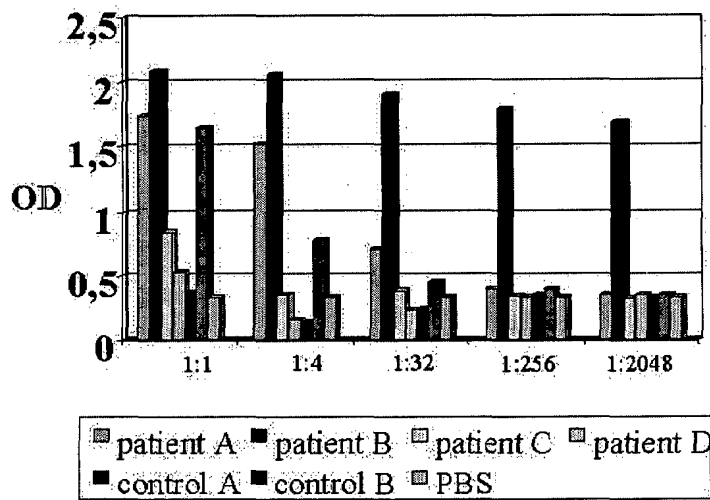


Fig. 2: ELISA mit Verdünnungsreihen verschiedener Seren von Patienten, die mit ch14.18 behandelt wurden auf 14G2a. Bei den Kontrollen handelt es sich um Seren gesunder Probanden. Man sieht deutlich, daß Patient B (gleichbleibend hohe Balken) noch bei starken Verdünnungsstufen bindende Antikörper im Serum aufweist.



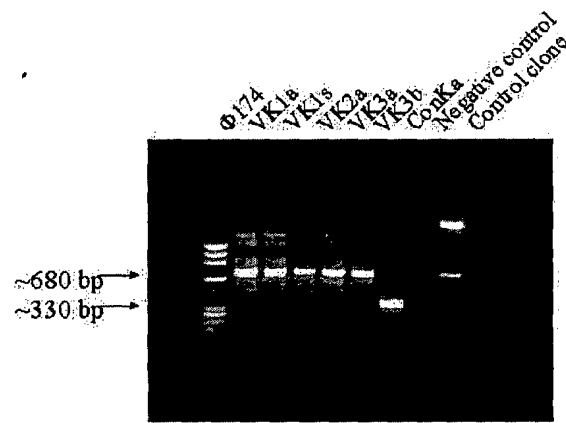


Fig. 3: RT-PCR für die kappa-Ketten mit fünf familienspezifischen Primern und Kontrollen.

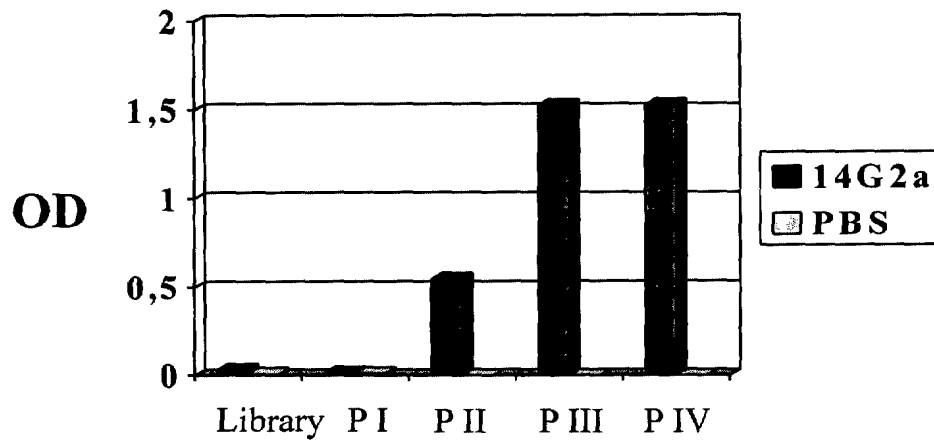


Fig. 4: ELISA der Fab-exprimierenden Phagen auf Antikörper 14G2a und PBS. Man sieht, daß die Phagentiter der Original-Antikörper-Bibliothek und nach dem ersten Biopanning so gering sind, daß sie im ELISA nicht nachweisbar ist. Ein progredienter Anstieg in den folgenden Biopanning-Schritten ist zu sehen.

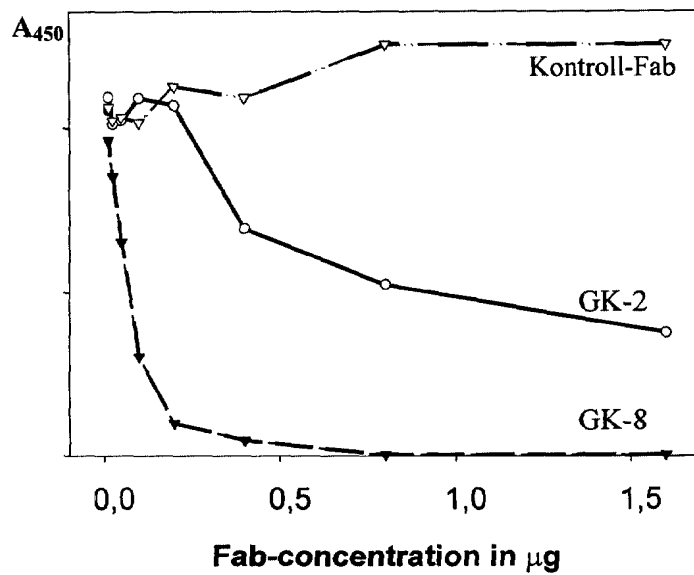


Fig. 5: Kompetitiver ELISA mit Inhibition der Bindung von ch14.18 an GD<sub>2</sub>: Man sieht deutlich, daß zwei exemplarisch gezeigte Klone, GK2 und GK8, in der Lage sind, die Bindung von ch14.18 auf GD<sub>2</sub> zu inhibieren. Als Kontrolle diente ein Fab-Fragment, welches BSA bindet.

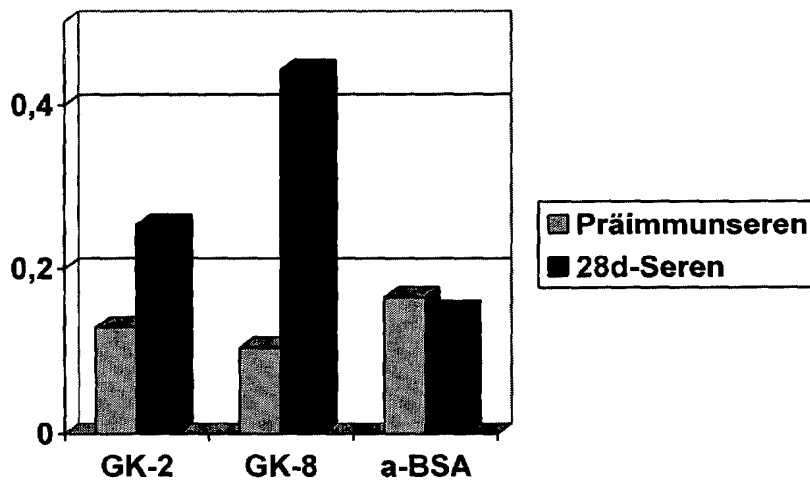


Fig. 6: ELISA mit Seren immunisierter Kaninchen auf GD2. Man sieht, daß Serumantikörper bereits vier Wochen nach der ersten Immunisierung (28 d) mit den beiden exemplarisch getesteten anti-Id GK2 und GK8 an GD2 binden. Als Vergleich dienten Präimmunseren und ein BSA-bindendes, humanes Fab. Damit ist die Immunogenität gegen GD2 (Ab3) induzierende Wirkung der anti-Id nachgewiesen.

**Fig. 7a: Aminosäuresequenzen der variablen Regionen antiidiotypischer Antikörper-Fab, die gegen anti-GD2-Antikörper gebildet wurden:**

Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten Ketten:

Klon GK-2:

ELTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT  
LTISSLQPEDFATYYCQSYSTPQTFGQGTKVEIK

Klon GK-8:

ELTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSRSGTD  
FTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPWTFGQETKVEIK

Klon T14-1:

ELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQLPGTAPKLLIYNNNQRPSPGVPDRFSGSKSGT  
SASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG

Klon T14-5:

ELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQLPGTAPKLLIYNNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSAS  
LAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLG

Klon T14-9:

ELTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLVWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATAIPDRFSGSGSGTDF  
TLTISRLEPEDFAVYYCQYGGSPPYTFGQGTKLEIK

Klon T14-10:

ELTQPPSASGTPGQKVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSPGVPDRFSGSKPG  
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-1:

ELTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNIVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT  
SATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSASDVVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-2:

ELTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNIVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT  
SATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSWVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-3:

ELQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNIVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTS  
ATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSLSAVVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-4:

ELTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT  
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGGSPRTFGQGTKVEIK

Klon TCH-5:

ELTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQRPQSAPTIVYENNQRPSPGVPDRFSGSIDSS  
SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNLWVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-6:

ELTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNIVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGT  
SATLGITGLQTGDEADYYCGTWADSLSVVFGGGTKLTVLG

Klon TCH-8:

ELTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISTSLNWFQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD  
FTLTISSLPTDFATYFCLQTYSTPWTFGQGTQVEVK

**Fig. 7b: Aminosäuresequenzen der variablen Regionen antiidiotypischer Antikörper-Fab, die gegen anti-GD2-Antikörper gebildet wurden:****Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der schweren Ketten:****Klon GK-2:**

EVQLLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGLFGPGQWELYIDYWGQGTLVTVSS

**Klon GK-8:**

EVQLLESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSNWSWVRQPPGKGLEWLGELDHIGSTNYPNPSLKSRT  
MSVDKSKNQFSLKLSSVSAADSAVYYCARHHPILGLDAFDIWGQGT TVTVSS

**Klon T14-1:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT  
ISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDERDFDWLLSPTLHYWGQGTLVTVSS

**Klon T14-5:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRLT  
ISRENAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDERDFDWLLSPTPNYWGQGTLVTVSS

**Klon T14-9:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF  
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGEDGILDYWGQGTLVTVSS

**Klon T14-10:**

EVQLLESGPRTGEASGTLSTCAVSGGSISSNWSWVRQPPGKGLVWIGDIYHSGSTSYNPSLKSRT  
SVDKSKNQFSELTSTVTAADTAVYYCARLDPDFYAFDIWGQGTMTVTVSS

**Klon TCH-1:**

EVKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTMTRDT  
SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFWSGYSPFDYWGQGTLVTVSS

**Klon TCH-2:**

EVQLLEQSGGGLVQPGGSLRLSCAAXGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG  
RFTISR XNSKNTLYLQMTSLRLEDTVVYYCVKDGGHYDFSSWGLGTLVTVSS

**Klon TCH-3:**

EVQLLEQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRHSMHWRQGP G KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLTAEDTAVYYCAKGQDWYYYDSSGWGYFDYWGQGTLVTVSS

**Klon TCH-4:**

EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSTYPMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSYEYYADSVKGR  
FAISRDN SKNTLNLQLNSLRPEDTAQYYCARDRYSDTPLPTGTQFIDYWGQGTLVTVSS

**Klon TCH-5:**

EVQLLEQSGAEVKKPGSSVKVSKASGDAFSTYAINWVRQAPGQGLEWMGGINPTFGTADY AQKFQ  
RVTITADESTAYMELSSLRSEDTAVYYCARETSLLTPDSFVYYFDYWGQGTLVTVSS

**Klon TCH-6:**

EVQLLEQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQ  
GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLFWSGYSPFDYWGQGTLVTVSS

**Klon TCH-8:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVSAISGSGDSTYYADSVKGRF  
TISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDGEGFGYYMDVWGKGTTVTVSS